肽聚糖识别蛋白 AaPGRP-LC 参与埃及伊蚊的抗细菌免疫反应

杨青泰[1], 赵莉蔺[1,2], 邹　振[2], 王燕红[2,*], 马瑞燕[1,*]

(1. 山西农业大学农学院, 山西太谷 030801;
2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】阐明在响应细菌感染的过程中,埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 体内肽聚糖识别蛋白 PGRP-LC(AaPGRP-LC)的功能。【方法】使用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术分析埃及伊蚊感染阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 后不同时间抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)基因的表达情况。结合 RNA 干扰技术和 qPCR 技术检测干扰 *AaPGRP-LC* 后免疫相关基因转录模式的变化。使用原核表达系统表达 AaPGRP-LC,并通过 Ni^{2+}-NTA 柱纯化,通过免疫印迹分析检测所纯化蛋白的质量。【结果】阴沟肠杆菌感染埃及伊蚊 6 h 后埃及伊蚊体内抗菌肽基因的转录水平显著升高。干扰 *AaPGRP-LC* 并用阴沟肠杆菌感染后,埃及伊蚊体内重要抗菌肽基因的转录水平显著降低,同时埃及伊蚊免疫缺陷(immune-deficiency, IMD)通路和 Toll 信号(Toll-like receptors)通路的免疫相关基因的表达量也显著降低。纯化得到条带单一的 AaPGRP-LC 蛋白。【结论】AaPGRP-LC 参与调控埃及伊蚊重要抗菌肽基因的转录,在埃及伊蚊响应细菌感染的过程中起到了重要的调控作用。AaPGRP-LC 在参与调控 IMD 通路的同时,也可能参与了 Toll 信号通路的调控过程。从原核表达系统中获得的 AaPGRP-LC 重组蛋白可用于下一步的功能研究。

关键词: 埃及伊蚊; 天然免疫; 细菌; 肽聚糖识别蛋白; 抗菌肽

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)01-0025-11

Peptidoglycan recognition protein AaPGRP-LC is involved in immune responses against bacteria in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

YANG Qing-Tai[1], ZHAO Li-Lin[1,2], ZOU Zhen[2], WANG Yan-Hong[2,*], MA Rui-Yan[1,*] (1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to elucidate the roles of peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) in response to bacterial infection in *Aedes aegypti*.【Methods】The mRNA abundance of genes of antimicrobial peptides (AMPs) in mosquitoes at different time after infection of *Enterobacter cloacae* was measured by quantitative real-time PCR (qPCR). After interference of *PGRP-LC* by RNA interference (RNAi), the expression profiles of immune-related genes were detected by qPCR. The recombinant protein AaPGRP-LC was expressed by prokaryotic expression system and purified through a Ni^{2+}-NTA agarose column. The quality of the purified recombinant protein was tested by Western blotting.【Results】Gram-negative *E. cloacae* bacteria could activate the expression of genes of AMPs in

---

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31402013); 国家自然科学基金项目(31672291)

作者简介: 杨青泰, 女, 1993 年 8 月生, 河南南召人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子免疫, E-mail: qingtai.yang@aliyun.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: wangyanhong@ioz.ac.cn; maruiyan2004@163.com

收稿日期 Received: 2017-07-23; 接受日期 Accepted: 2017-09-24

Ae. aegypti at 6 h post infection. After depletion of *AaPGRP-LC*, the transcription levels of genes of AMPs were significantly decreased during bacterial infection. The expression levels of immune-related genes involved in Toll and IMD pathways were down-regulated after interference of *AaPGRP-LC*. Western blotting of the purified recombinant protein AaPGRP-LC showed a clear and unique target band. 【Conclusion】AaPGRP-LC modulates the transcriptional expression of genes of many essential AMPs and plays an important regulatory role in response to bacterial infection. It is involved in the regulation of IMD pathway and may also regulate the Toll pathway. The obtained recombinant AaPGRP-LC can be used in the follow-up study.

Key words: *Aedes aegypti*; innate immunity; bacteria; peptidoglycan recognition proteins; antimicrobial peptides

天然免疫系统作为节肢动物仅有的免疫系统，是昆虫抵御真菌、细菌、病毒等病原体入侵的唯一途径（Lavine and Strand, 2002; Akira *et al*., 2006; Lemaitre and Hoffmann, 2007），也是从无脊椎动物到脊椎动物保守的防卫机制（Xiong *et al*., 2015）。该免疫系统主要包括两大部分，细胞免疫和体液免疫，二者协同合作对生物体形成有效的保护（Hultmark, 2003）。细胞免疫通过血细胞对病原体的吞噬作用、集结作用和包囊作用消灭病原体。体液免疫通过生成黑色素和产生抗菌肽（antimicrobial peptides, AMPs）来防御病原体。抗菌肽的产生主要依赖于 Toll 信号（Toll-like receptors）通路和免疫缺陷（immune-deficiency, IMD）通路（Meng *et al*., 2015），在昆虫受到病原体攻击时，这两个通路会引起转录因子 NF-κB 的释放，最终在脂肪体细胞中合成抗菌肽并将抗菌肽分泌到血淋巴中（Janeway and Medzhitov, 2002; Lemaitre and Hoffmann, 2007）。

这些免疫通路的激活主要依赖于宿主的模式识别受体（pattern recognition receptors, PRRs）识别病原体病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）（Janeway and Medzhitov, 2002; Yu *et al*., 2002; Hetru and Hoffmann, 2009），一旦 PAMPs 被昆虫的 PRRs 所识别，昆虫的天然免疫反应就会被迅速激活以产生效应分子清除外源物（林哲等, 2013）。病原体的 PAMPs 通常是保守的，例如细菌的肽聚糖（peptidoglycan, PGN）、脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）和真菌的葡聚糖（β-1,3-glucan）等。PGN 由聚糖骨架和四肽侧链组成（Schleifer and Kandler, 1972）。所有的革兰氏阴性细菌和部分革兰氏阳性细菌的 PGN 在三肽的位置上有一个二氨基庚二酸（DAP）残基，其他的革兰氏阳性细菌在该位置有一个 L-赖氨酸（Lys）残基（Schleifer and Kandler, 1972）。

肽聚糖识别蛋白（peptidoglycan recognition proteins, PGRPs）是进化上高度保守的识别 PGN 的关键 PRR（Leulier *et al*., 2003; Royet *et al*., 2011）。无论是昆虫还是哺乳动物，其 PGRP 的 C 端都有一个高度保守的约 160 个氨基酸的 PGRP 结构域（Werner *et al*., 2000; Dziarski and Gupta, 2006），该结构域与细菌的 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶（N-acetylmuramyl-L-alanine amidases）同源性很高（Yoshida *et al*., 1996; Kurata, 2014）。根据转录本的大小和结构域的构成，可以将昆虫的 PGRP 分为胞外短型 PGRP（short form PGRPs, PGRP-SX）和跨膜或膜内的长型 PGRP（long form PGRPs, PGRP-LX）（Royet *et al*., 2011）。也可以根据是否具有酶活性将 PGRP 分为催化型 PGRP 和结合型 PGRP。催化型 PGRP 可以清除 PGN 或具有杀菌活性（Mellroth and Steiner, 2006; Zaidman-Remy *et al*., 2006, 2011; Paredes *et al*., 2011; Costechareyre *et al*., 2016），结合型 PGRP 可以结合 PGN 并将信号传递给下游信号通路（Royet *et al*., 2011）。

PGRP 首次在家蚕 *Bombyx mori* 中被检测到，发现其可以结合 Lys 型 PGN 并激活黑化途径的酚氧化酶原（proPO）（Zaidman-Remy *et al*., 2006）。随后在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Werner *et al*., 2000; Dziarski and Gupta, 2006）、烟草天蛾 *Manduca sexta*（Yu *et al*., 2002）和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Christophides *et al*., 2002）等昆虫中也陆续被发现。在黑腹果蝇体内，不同类型的细菌 PGN 可以与不同的宿主 PGRP 结合激活不同的免疫通路（Leulier *et al*., 2003; Stenbak *et al*., 2004; Kaneko *et al*., 2004）。其中跨膜蛋白 PGRP-LC 作为 IMD 通路上游重要的肽聚糖识别蛋白，可以识别 DAP 型的肽聚糖从而在脂肪体内激活 IMD

通路（Gottar *et al*., 2002）。

尽管在黑腹果蝇和冈比亚按蚊等昆虫中 PGRP 家族的分类和功能都已经有了详实的研究,关于埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中 PGRP 家族的分类也曾有报道,但对埃及伊蚊中不同 PGRP 的功能还知之甚少。本研究聚焦于埃及伊蚊肽聚糖识别蛋白 PGRP-LC,探究其在埃及伊蚊抗细菌免疫过程中的作用,通过对该蛋白的了解,为虫媒疾病的防控提供了理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

参照 Hays 和 Raikhel(1990)的方法饲养埃及伊蚊 UGAL/Rockefeller 品系。成虫以蒸馏水和 10% 的蔗糖溶液喂养。蚊虫羽化 72 h 后喂养鸡血满足其生殖所需的营养,喂血 72 h 后放置潮湿的滤纸供其产卵。所有使用动物的试验均符合《实验动物管理条例》的相关要求并获得中国科学院动物研究所动物保护协会和动物使用委员会的批准。

1.2　细菌侵染和材料采集

阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,于营养肉汁培养基中培养,其培养温度为 37℃。蚊虫羽化后 72 h 进行感染实验。无菌的 PBS 溶液作为对照。将阴沟肠杆菌摇至对数生长期,光密度值达到 0.8 ~ 1.0 后,2 500 ×g 离心 5 min,用无菌的 PBS 溶液洗 3 次,悬浮后使用针尖蘸取,选择雌性蚊虫进行感染（Zou *et al*., 2010）。阴沟肠杆菌感染后 6, 24 和 48 h,每个样品取 8 头相同处理的蚊虫完整虫体,转移至 TRI Reagent（Sigma）中,用电动研磨器（Kontes, Vineland, NJ）研磨（Wang *et al*., 2015）并储存于 -80℃ 冰箱中。

1.3　RNA 干扰(RNAi)

参照 Zou 等(2013)的方法使用 T7 RiboMAX Express RNAi System（Promega）试剂盒并参考其说明书进行引物的设计及 *AaPGRP-LC*（GenBank 登录号：CH478382.1）双链 RNA 的合成。选择绿色荧光蛋白（green fluorescence protein）基因 *GFP*（GenBank 登录号：MF136447.1）合成双链 RNA 作为对照（Wang RJ *et al*., 2017）。使用的引物序列如表 1 所示。

取羽化 24 h 内的雌性蚊虫,使用 Nanoliter 2000 Injector（World Precision Instrument）将双链 RNA (4 μg/μL, 0.3 ~ 0.5 μL)注入其胸部,进行干扰实验（Wang *et al*., 2015; Zhao B *et al*., 2016）。注射双链 RNA 后 48 h 进行感染实验(即蚊虫羽化后 72 h 进行感染实验),阴沟肠杆菌感染后 6 h 进行材料采集,细菌侵染和材料采集方法均与 1.2 节一致。

1.4　RNA 提取、cDNA 的获得和实时荧光定量 PCR(qPCR)实验

参考 Wang XL 等(2017)的方法对 1.2 和 1.3 节采集的材料进行总 RNA 提取。使用 NanoDrop 1000 Spectrophotometer（NanoDrop, Wilmington, DE, USA)测取 RNA 浓度并制备 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其降解情况。

每个处理取 1 μg 总 RNA, 使用 TaKaRa 的 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录得到 cDNA。

使用 Primer Premier 5 在定量所需检测基因的编码区设计引物,引物序列如表 1 所示。检测基因包括肽聚糖识别蛋白基因 *PGRP-LC*, *PGRP-LE*（GenBank 登录号：CH477976.1）和 *PGRP-LB*（GenBank 登录号：CH477643.1),抗菌肽基因 *CecA*（GenBank 登录号：CH477197.1）, *DefA*（GenBank 登录号：CH477283.1）, *Att*（GenBank 登录号：CH477270.1)和 *Dipt*（GenBank 登录号:CH477317.1),IMD 通路相关基因 *Uev1A*（GenBank 登录号：CH477810.1）, *Dredd*（GenBank 登录号：CH478203.1）, *Kenny*（GenBank 登录号：CH477889.1）, *Ankyrin*1（GenBank 登录号：CH477646.1）, *Ankyrin*2（GenBank 登录号：CH478148.1）和 *Ankyrin*3（GenBank 登录号：CH477734.1)以及 Toll 信号通路相关基因 *Toll1A*（GenBank 登录号：CH477452.1）, *Tube*（GenBank 登录号：CH477455.1）和 *Spätzle*2（GenBank 登录号：CH477217.1）。使用 TaKaRa 的 SYBR *Premix Ex* Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒和 PIKOREAL 96(Thermo SCIENTIFIC)系统进行实时荧光定量 PCR 实验（Zhao L *et al*., 2016）。在实时荧光定量 PCR 实验中,以埃及伊蚊内源核糖体蛋白 S7（S7 ribosomal protein）基因 *RPS*7（GenBank 登录号：CH477586.1)为内参均衡模板浓度（Hou *et al*., 2015),每种处理设置 3 个生物学重复。定量体系总体积为 10 μL:上下游引物各 1 μL, 5 μL SYBR *Premix Ex* Taq, 1 μL 稀释模板 cDNA, 2 μL 灭菌的去离子水。qPCR 反应条件：95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火延伸 20 s, 40 个循环。定量数据使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对

表达量的计算。

1.5 AaPGRP-LC 的克隆表达和纯化

使用 Primer Premier 5 在 *AaPGRP-LC* 基因的编码区设计引物(表 1),以 1.4 节获得的 cDNA 为模板,用高保真酶 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 扩增 *AaPGRP-LC* 并将其克隆至表达载体 pET-28a 上,构建表达质粒 pET-*AaPGRP-LC* 并转化入大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,测序后比对选定序列正确的单克隆(Wang YH *et al*., 2017)。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	目的产物 Target product
qPCR-CecA-F	TGGCTGTTCTTCTCCTGACC	*CecA*
qPCR-CecA-R	CCCAGCTACAACTGGAAGAGC	
qPCR-DefA-F	AACTGCCGGAGGAAACCTAT	*DefA*
qPCR-DefA-R	AATGCAATGAGCAGCACAAG	
qPCR-Att-F	TTGGCAGGCACGGAATGT	*Att*
qPCR-Att-R	CGCCCAGACCTAAGGAAGC	
qPCR-Dipt-F	ATCAACAGGACGAAGGAACG	*Dipt*
qPCR-Dipt-R	GTCTCCCTGAAATCCACCAA	
T7-AaPGRP-LC-F	TAATACGACTCACTATAGGGCCGAATATTGGCAGTATAGC	T7-*AaPGRP-LC*
T7-AaPGRP-LC-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGTGTGAGCACCCTGTTTAT	
T7-GFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGCACAAGTTCAGCGTGTCCG	T7-*GFP*
T7-GFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGGTTCACCTTGATGCCGTTC	
qPCR-PGRP-LC-F	CAACCGGGCAGTCAGTTAGT	*AaPGRP-LC*
qPCR-PGRP-LC-R	TGTTGCCAAACGTGATGTCT	
qPCR-PGRP-LE-F	TTCTCTTGGATCCAGCTCGT	*AaPGRP-LE*
qPCR-PGRP-LE-R	CATTGTTCGTGGTGGAAGTG	
qPCR-PGRP-LB-F	ATTTAACGTCGTGGGAGCAC	*AaPGRP-LB*
qPCR-PGRP-LB-R	TGATATTGTTCCGCACTCCA	
qPCR-Uev1A-F	TACCGCGTAATTTCCGACTC	*Uev1A*
qPCR-Uev1A-R	ATGATCATGCCAGTCCAGTG	
qPCR-Dredd-F	TTCAACCGGGACCTACAATC	*Dredd*
qPCR-Dredd-R	CCGCATTCTTCCACGATATT	
qPCR-Kenny-F	TAAACCGAACAAACCGGAAG	*Kenny*
qPCR-Kenny-R	AAATTCTTCGCCACGATGAC	
qPCR-Ankyrin1-F	AACGCGACCATGGATAAGAC	*Ankyrin*1
qPCR-Ankyrin1-R	CGTCCGGTATTGTCCTGACT	
qPCR-Ankyrin2-F	CGGAGTGGTCACCTTTCAAT	*Ankyrin*2
qPCR-Ankyrin2-R	GATTGACGATGTCGATGTGG	
qPCR-Ankyrin3-F	GCATGGTGCTACAATGGATG	*Ankyrin*3
qPCR-Ankyrin3-R	ATCTTCCCGTTTCACGAATG	
qPCR-Spz2-F	CGTTGAAAGGTGGGAAAGTC	*Spätzle*2
qPCR-Spz2-R	GTCTGCTAAGTTGGGACACG	
qPCR-Toll1A-F	ATGGTTCTGGGACAAACTGC	*Toll1A*
qPCR-Toll1A-R	TTATCGTCGACGGAGCTCTT	
qPCR-Tube -F	CGCTATGTTTGGTCTATGAA	*Tube*
qPCR-Tube -R	TCGAGTAACGGTGAGATGCA	
AaPGRP-LC-F	AGAAGTCAACAAAACAC	*AaPGRP-LC*
AaPGRP-LC-R	TCATTCCTGCCAATGGTT	
qPCR-RPS7-F	TCAGTGTACAAGAAGCTGACCGGA	*RPS7*
qPCR-RPS7-R	TTCCGCGCGCGCTCACTTATTAGATT	

使用 TIANGEN 的快速质粒小提试剂盒提取其质粒并转化入 BL21 大肠杆菌感受态细胞(天根生化科技(北京)有限公司)中，于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中在 37℃下培养至对数生长期。加入 0.5 mmol/L 的 IPTG，16℃培养 18 ~ 20 h。于 4℃离心富集菌体，用 PBS 溶液重悬，再次富集菌体后用 lysis buffer（5 mmol/L Tris-HCl 和 30 mmol/L NaCl 溶于去离子水中，pH 7.5）重悬，于冰上进行超声破碎（Chen *et al*., 2014）。高速离心后取上清液过 Ni^{2+}-NTA agarose column（Qiagen）得到重组蛋白。使用 4% ~ 15% gradient SDS-polyacrylamide gels（Bio-Rad）进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）并用考马斯亮蓝染色，结合蛋白质免疫印迹分析(Western blotting）进行重组蛋白质量检测。

1.6　免疫印记分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转至 PVDF 膜（Invitrogen）上。TBST 洗膜 5 min，封闭液封闭 5 min，加入一抗 Anti His-Tag Mouse Monoclonal Antibody(康为世纪)室温反应 2 h，TBST 洗膜 4 次，与二抗 Anti-Mouse IgG（H + L），HRP Conjugate（Promega）室温反应 2 h，再用 TBST 洗膜 4 次后进行曝光（Hansen *et al*., 2005）。

1.7　数据统计与分析

实验数据使用 Excel 2007 和 GraphPad Prism 6 进行分析、处理和绘图，实验结果用平均值 ± 标准误（*SE*）表示，处理间的差异使用 Student's *t* 检验进行分析，差异显著水平为 $P < 0.05$。

2　结果

2.1　革兰氏阴性细菌阴沟肠杆菌感染激活埃及伊蚊抗菌肽基因表达

qPCR 结果显示(图 1)，在感染阴沟肠杆菌后的 6 h 和 24 h(图 1：A – D)，埃及伊蚊的抗菌肽基因 *CecA*, *DefA*, *Att* 和 *Dipt* 的表达在 mRNA 水平上均显著上调，其中 24 h 的上调倍数通常低于 6 h。在感染后的 48 h，*CecA* 和 *Att* 基因表达显著下调(图 1：A 和 D)，*DefA* 和 *Dipt* 表达上调但与 PBS 处理的埃及

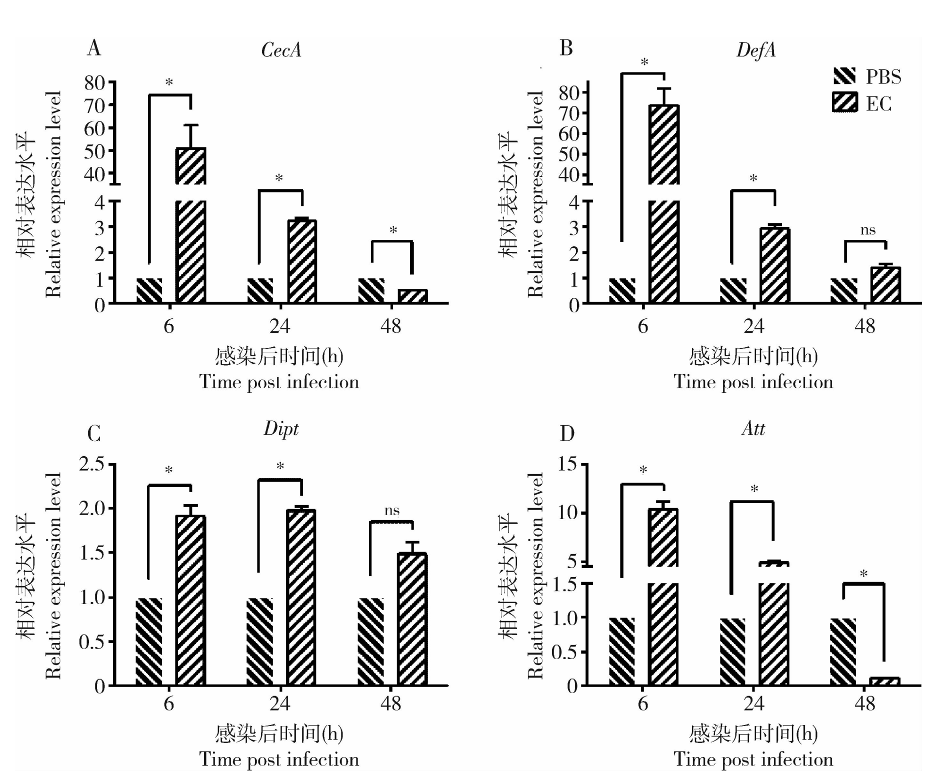


图 1　阴沟肠杆菌感染埃及伊蚊后不同时间宿主体内抗菌肽基因的转录水平

Fig. 1　Transcription levels of AMP genes in *Aedes aegypti* at different time after *Enterobacter cloacae* infection

A：*CecA*；B：*DefA*；C：*Dipt*；D：*Att*. PBS：对照 Control；EC：阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*. 数据为平均值 ± 标准误。*RPS7* 作为内参基因，PBS 处理组的表达量为对照。差异显著性用 Student's *t* 检验进行分析。Data are mean ± *SE*. *RPS7* was set as the internal reference to determine the relative expression level, which is normalized to the level of PBS treatment group. The significance between different treatments was tested by Student's *t*-test. *：$P < 0.05$；ns：$P > 0.05$.

伊蚊相比没有显著差异(图 1: B 和 C)。作为抗菌肽的代表(Waterhouse *et al.*, 2007),*CecA* 和 *DefA* 表达在用阴沟肠杆菌感染后的埃及伊蚊中被大量诱导,6 h 时达到 50 ~ 80 倍(图 1: A 和 B)。这说明阴沟肠杆菌的感染可以在短时间内迅速激活埃及伊蚊的免疫反应,但是由于 Toll 信号通路和 IMD 通路可以共同调节抗菌肽的产生(Zou *et al.*, 2011),并不能确定阴沟肠杆菌的感染主要激活了哪一个信号通路。

2.2 AaPGRP-LC 调控抗菌肽基因的表达

为了验证利用 RNAi 干扰埃及伊蚊 *PGRP-LC* 以后,在埃及伊蚊响应阴沟肠杆菌感染的过程中,*PGRP-LC* 的转录水平下调对抗菌肽基因表达量的影响,本研究应用 qPCR 技术对其转录模式进行了检测。结果显示,感染阴沟肠杆菌并不会提高 *PGRP-LC* 的转录水平(图 2: A)。整体来看,干扰 *PGRP-LC* 后,其转录水平降低了约 75%(图 2: A)。同时,对 *PGRP-LC* 的干扰并不会影响其同家族成员 *PGRP-LE* 的转录水平,且 *PGRP-LE* 的转录水平同样不受阴沟肠杆菌感染的影响(图 2: B)。

感染阴沟肠杆菌后的埃及伊蚊中,抗菌肽基因 *CecA* 和 *DefA* 的表达量均显著升高,干扰不同的基因对该现象并无影响(图 2: D 和 E)。但是,与干扰 *GFP* 的埃及伊蚊相比,干扰 *PGRP-LC* 后的埃及伊蚊中抗菌肽基因 *CecA* 和 *DefA* 的转录水平显著降低(图 2: D 和 E)。用阴沟肠杆菌的感染来刺激干扰 *PGRP-LC* 的埃及伊蚊,*CecA* 和 *DefA* 基因的表达水平虽然有所升高,但依旧显著低于干扰 *GFP* 后感染阴沟肠杆菌的埃及伊蚊中这两个基因的转录水平(图 2: D 和 E)。这表明 *PGRP-LC* 转录水平的降低严重影响了埃及伊蚊应对革兰氏阴性细菌阴沟肠杆菌感染所引起的免疫反应。进一步确认了 PGRP-LC 在埃及伊蚊响应细菌感染中的重要地位。

不同于其同家族成员 *PGRP-LE*, *PGRP-LB* 的转录水平显示出与 *CecA* 和 *DefA* 基因的表达模式相似的趋势(图 2: C),其表达量在埃及伊蚊受到感染后

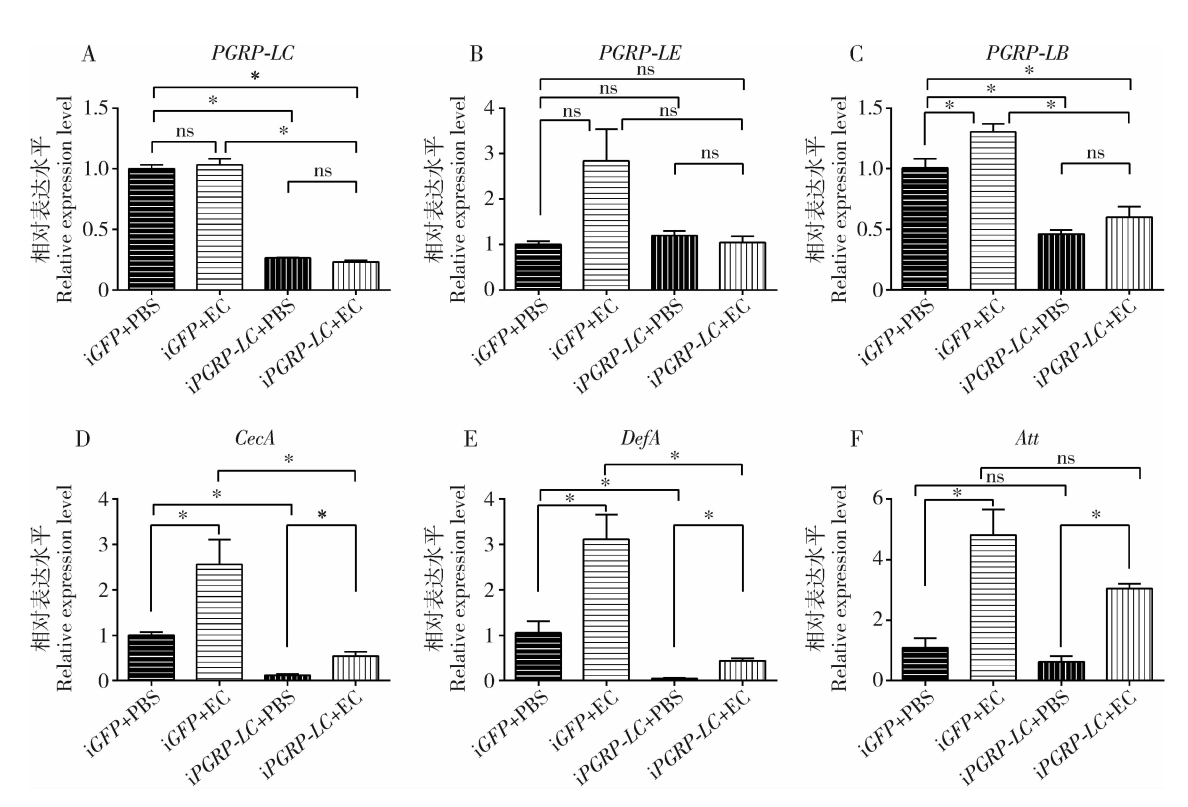


图 2 RNAi 干扰 *AaPGRP-LC* 和感染阴沟肠杆菌对埃及伊蚊抗菌肽基因转录水平的影响

Fig. 2 Transcription levels of genes of AMPs in *Aedes aegypti* after interference of *AaPGRP-LC* by RNAi and *Enterobacter cloacae* infection

A: *PGRP-LC*; B: *PGRP-LE*; C: *PGRP-LB*; D: *CecA*; E: *DefA*; F: *Att*. PBS: 对照 Control; EC: 阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*; i*PGRP-LC*: 干扰 *PGRP-LC* Interference of *PGRP-LC*. 数据为平均值 ± 标准误。*RPS*7 作为内参基因,敲除 *GFP*(*iGFP*)后 PBS 处理组的表达量为对照。差异显著性用 Student's *t* 检验进行分析。Data are mean ± *SE*. *RPS*7 was set as the internal reference to determine the relative expression level, which is normalized to the level of i*GFP* and PBS treatment group. The significance between different treatments was tested by Student's *t*-test. *: $P<0.05$; ns: $P>0.05$. 图 3 ~ 4 同 The same for Figs. 3 and 4.

显著增加，说明 *PGRP-LB* 的转录水平受到了细菌感染的影响。在干扰 *PGRP-LC* 后的埃及伊蚊中，其表达量显著降低，说明 *PGRP-LB* 的转录水平是受 PGRP-LC 影响的。

相对于 PBS 处理，抗菌肽 *Att* 基因的表达量在感染阴沟肠杆菌后显著升高（图 2：F）。不同于 *CecA* 和 *DefA* 基因，在干扰 *PGRP-LC* 后，与干扰 *GFP* 的埃及伊蚊相比，对埃及伊蚊做相同的感染处理，*Att* 基因的表达量并没有显著变化，推测 PGRP-LC 并不调控该基因的表达。

2.3 AaPGRP-LC 调节 IMD 通路下游基因的表达

埃及伊蚊感染阴沟肠杆菌后，IMD 通路的免疫相关基因 *Ankyrin*，*Uev1A*，*Dredd* 和 *Kenny*（Nene *et al.*, 2007）的表达量并未出现显著变化（图 3：A – F）。在干扰 *PGRP-LC* 并 PBS 处理的埃及伊蚊中，其转录水平显著低于干扰 *GFP* 并 PBS 处理的埃及伊蚊；在干扰 *PGRP-LC* 的基础上感染阴沟肠杆菌后，*Uev1A*，*Dredd* 和 *Kenny* 基因的表达量依然显著低于干扰 *GFP* 并感染阴沟肠杆菌的埃及伊蚊（图 3：A – C）。说明埃及伊蚊中 *PGRP-LC* 的转录本水平下降严重影响了 IMD 通路免疫相关基因的表达量。

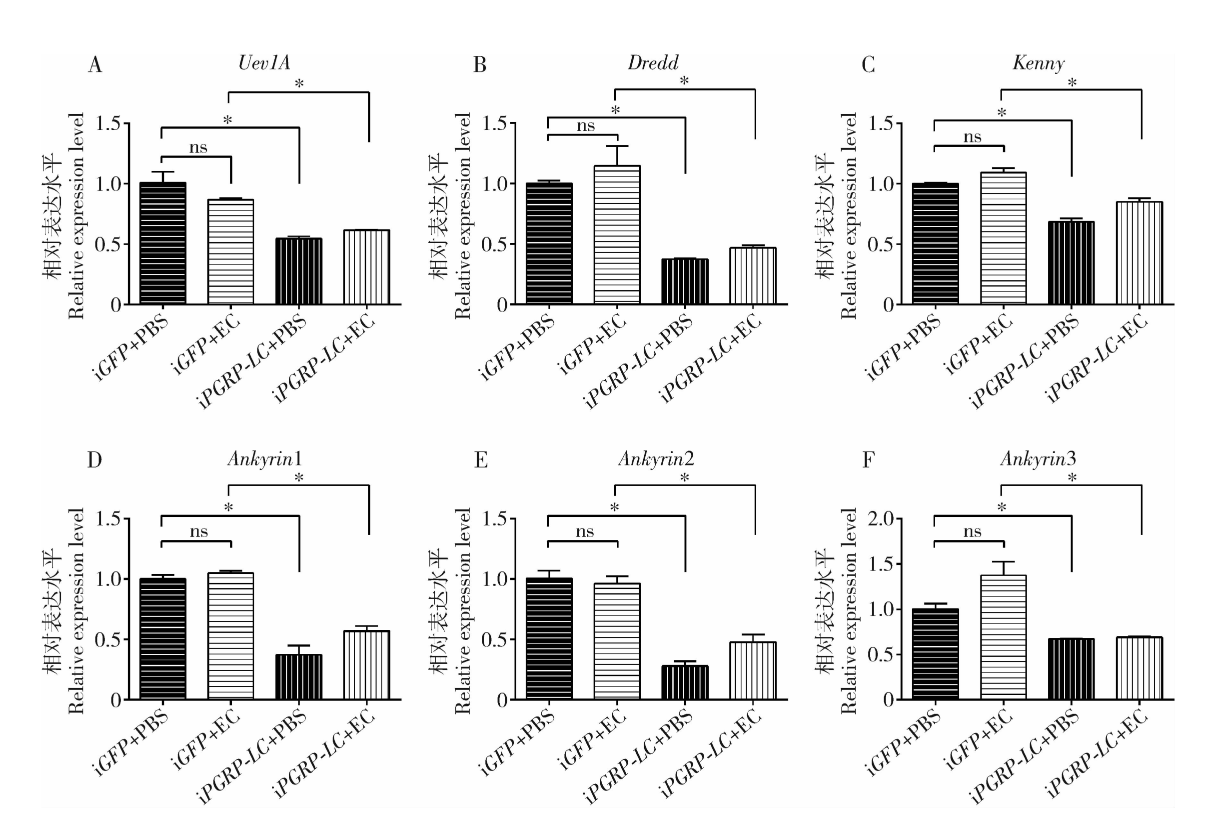


图 3　RNAi 干扰 *AaPGRP-LC* 和感染阴沟肠杆菌对埃及伊蚊 IMD 通路相关基因转录水平的影响

Fig. 3　Transcription levels of selected immune-deficiency pathway-related genes in *Aedes aegypti* after interference of *AaPGRP-LC* by RNAi and *Enterobacter cloacae* infection

A：*Uev1A*；B：*Dredd*；C：*Kenny*；D：*Ankyrin*1；E：*Ankyrin*2；F：*Ankyrin*3.

2.4 AaPGRP-LC 调节 Toll 信号通路下游基因的表达

用阴沟肠杆菌的感染来刺激埃及伊蚊后，Toll 信号通路成员 *Spätzle*2，*Toll1A* 和 *Tube*（Nene *et al.*, 2007）基因的转录水平显著上升。干扰 *PGRP-LC* 的埃及伊蚊，与干扰 *GFP* 的埃及伊蚊相比，同样的感染处理后，Toll 信号通路成员 *Spätzle*2，*Toll1A* 和 *Tube* 基因均显著下调，呈现出和 IMD 通路免疫相关基因相似的表达模式（图 4：A – C），推测埃及伊蚊中 *PGRP-LC* 的转录水平下降可能会影响到 Toll 信号通路的免疫相关基因的转录和表达。

2.5 AaPGRP-LC 的原核表达

为了进一步探究 PGRP-LC 在埃及伊蚊响应细菌感染中的作用，本研究应用原核表达系统对 AaPGRP-LC 进行表达和纯化。将测序正确的原核表达质粒 pET-*AaPGRP-LC* 转化入大肠杆菌 BL21，在 IPTG 诱导表达后，经 Ni^{2+}-NTA agarose column 得到重组蛋白。

取适量纯化得到的重组蛋白,经 SDS-PAGE 检测后发现 45 kD 处有与预期分子量大小相等的目的条带(图 5: A)。超滤浓缩后,取部分样品经 Western blotting 检测,结果表明(图 5: B),该蛋白正是本试验所需的含有 6 个 His 标签的重组蛋白 AaPGRP-LC。

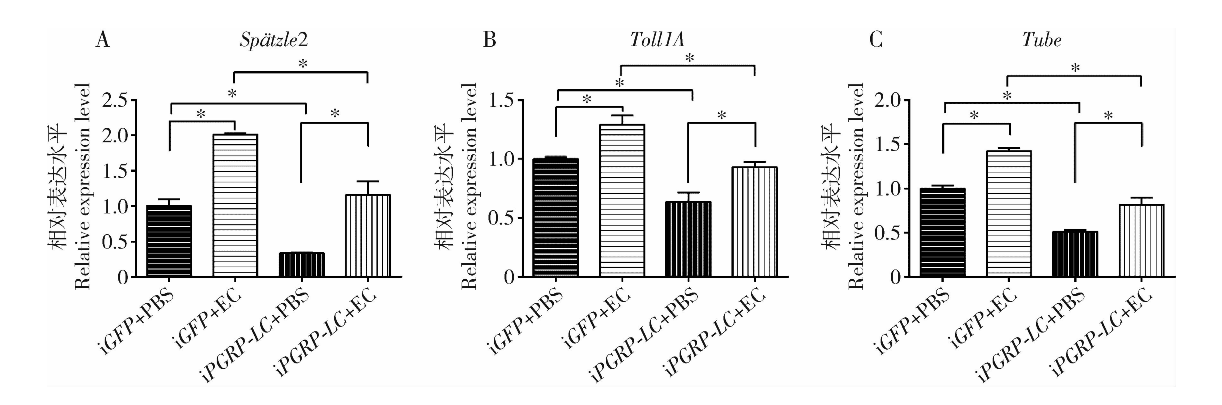


图 4 干扰 *AaPGRP-LC* 和感染阴沟肠杆菌对埃及伊蚊 Toll 信号通路相关基因转录水平的影响

Fig. 4 Transcription levels of selected Toll pathway-related genes in *Aedes aegypti* after RNAi of *AaPGRP-LC* and *Enterobacter cloacae* infection

A: *Spätzle2*; B: *Toll1A*; C: *Tube*.

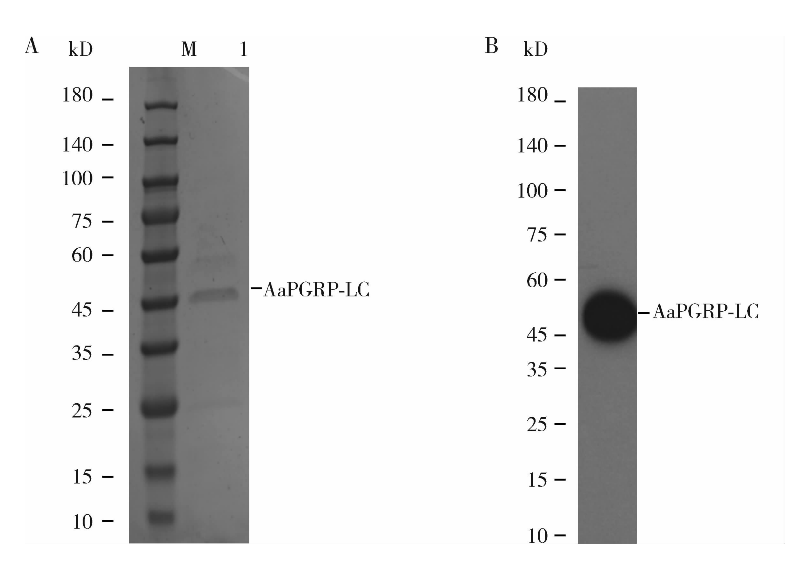


图 5 重组蛋白 AaPGRP-LC 的 SDS-PAGE(A)和免疫印迹分析(B)

Fig. 5 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) results of the recombinant protein AaPGRP-LC

M: 预染标准蛋白 Prestained protein ladder; 1: 重组蛋白 AaPGRP-LC Recombinant protein AaPGRP-LC.

3 讨论

虫媒病原通过媒介生物进行传播,而伊蚊正是登革热和寨卡病毒病的传播媒介(王燕红等, 2017)。当病原体进入蚊虫体内之后,蚊虫的免疫模式识别分子可以及时识别病原体的表面模式分子,并激活细胞免疫和体液免疫对其进行攻击和清除,该过程被称为蚊虫的免疫监视机制(immune surveillance)。肽聚糖识别蛋白作为蚊虫的主要免疫识别分子家族之一,关于它的研究对于降低蚊虫的免疫力从而有效控制虫媒疾病的传播具有重要意义。

不同于其他昆虫,抗菌肽在蚊虫中虽然数目和种类并没有大的变化,但其对于蚊虫的免疫反应却意义重大(王燕红等, 2013)。在冈比亚按蚊中,细菌的感染可以迅速激活宿主抗菌肽基因的表达从而对病原体进行防御和攻击(Dimopoulos *et al.*, 2002)。在埃及伊蚊中,相对于 PBS 处理对照组,革兰氏阴性细菌阴沟肠杆菌的感染在 6 h 时便可以大幅提升宿主体内抗菌肽基因 *CecA*, *DefA*, *Dipt* 和 *Att* 的转录水平。这表明这 4 种抗菌肽在埃及伊蚊的抗

细菌免疫中作用巨大。与 PBS 处理相比,感染阴沟肠杆菌后 24 h 时的抗菌肽基因转录水平显著升高,但较感染阴沟肠杆菌后 6 h 时的抗菌肽转录水平,其上升幅度较小。感染阴沟肠杆菌后 48 h 时埃及伊蚊体内部分抗菌肽的转录本水平开始显著降低,我们推测在埃及伊蚊中,细菌的感染可以迅速大量激活抗菌肽基因的表达,对病原体进行杀灭。随着时间的推移,抗菌肽基因的表达量逐渐减少,伴随着对病原体的防御作用减弱,病原体对寄主的影响开始变得明显;或者是随着时间的推移,抗菌肽杀灭了部分病原体,宿主对其需求降低。

蚊虫的 3 种信号通路——IMD 途径、Toll 信号通路途径和 JAK-STAT(janus kinase-signal transducer and activator of transcription)途径在进化上都十分保守(De Gregorio *et al.*, 2002; Dostert *et al.*, 2005; 王燕红等, 2013)。PGRP-LC 作为一种跨膜蛋白(Wang and Beerntsen, 2015),其结合革兰氏阴性细菌进而激活 IMD 通路的作用在黑腹果蝇(Schmidt *et al.*, 2008)和冈比亚按蚊(Meister *et al.*, 2009)中均有报道,推测其在埃及伊蚊中也具有进化保守的激活 IMD 通路的功能。

在果蝇中,PGRP-LE 和 PGRP-LC 协同激活 IMD 通路(Kaneko *et al.*, 2006)。本研究在利用 RNAi 干扰 *PGRP-LC* 后对 *PGRP-LE* 的转录水平进行了检测,发现并不存在基因的交叉干扰。在 *PGRP-LE* 正常转录的情况下,*PGRP-LC* 的转录水平下降严重影响了埃及伊蚊感染阴沟肠杆菌后抗菌肽的转录水平。这说明 *PGRP-LE* 并不能有效补足 *PGRP-LC* 转录水平下降对免疫系统的影响,*PGRP-LE* 在埃及伊蚊响应革兰氏阴性细菌感染的过程中只起到协助作用而并不关键,该结果与果蝇中的情况一致(Kaneko *et al.*, 2006)。

另外,在干扰 *AaPGRP-LC* 后,埃及伊蚊中抗菌肽基因的转录水平显著下调,这表明 PGRP-LC 参与调控埃及伊蚊体内抗菌肽的表达。但是干扰 *AaPGRP-LC* 后感染阴沟肠杆菌,抗菌肽的表达水平依旧显著低于干扰 *GFP* 的埃及伊蚊。这说明不论是否存在感染,PGRP-LC 对抗菌肽的表达水平都有着十分关键的影响。鉴于抗菌肽在埃及伊蚊免疫系统中的重要地位,这表明 PGRP-LC 在埃及伊蚊的免疫系统中起到了关键的调控作用。

与此同时,PGRP-LC 的同家族成员 PGRP-LB 表现出和抗菌肽相似的表达模式。作为一种具有酶活性位点的胞外短型 PGRP(Wang and Beerntsen, 2015),埃及伊蚊的 PGRP-LB 可能同果蝇中的 PGRP-LB 一样(Kim *et al.*, 2003; Zaidman-Remy *et al.*, 2006),主要作用于杀菌过程。

此外,埃及伊蚊感染阴沟肠杆菌后,IMD 通路的免疫相关基因 *Ankyrin*, *Uev1A*, *Dredd* 和 *Kenny* 的转录水平并未出现显著变化。由于在 IMD 通路 Ankyrin 和 Kenny 是受磷酸化修饰的, Uev1A 和 Dredd 是受泛素化修饰的(Nene *et al.*, 2007),推测在其调控免疫反应的过程中可能并不需要表达量的显著变化。但是干扰 *AaPGRP-LC* 后, *Ankyrin*, *Uev1A*, *Dredd* 和 *Kenny* 的表达量都显著降低,这说明 PGRP-LC 可能参与了 IMD 通路的调控。因此,我们推测在埃及伊蚊中,PGRP-LC 调控 IMD 通路的功能是保守的。

同时,Toll 信号通路膜受体基因 *Toll1A*、Toll 受体的配体基因 *Spätzle2* 和 Toll 信号通路下游 *Tube* 基因的表达量在感染阴沟肠杆菌后显著上调,这表明革兰氏阴性细菌在感染埃及伊蚊后也可以激活 Toll 信号通路相关基因的表达。在干扰埃及伊蚊 *PGRP-LC* 后,*Toll1A*, *Spätzle2* 和 *Tube* 基因的转录水平显著降低。Toll 信号通路免疫相关基因的表达量变化意味着 PGRP-LC 可能以某种方式参与了 Toll 信号通路的调控过程,在埃及伊蚊中可能存在着同冈比亚按蚊(Meister *et al.*, 2009)和果蝇(Valanne, 2014; Kurata, 2014)类似的交叉调控方式。我们进一步通过原核表达系统获得 AaPGRP-LC 的重组蛋白,为从蛋白水平继续探索其功能奠定了基础。

参考文献(References)

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783–801.

Chen KK, Liu C, He Y, Jiang HB, Lu ZQ, 2014. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.*, 45(1): 1–9.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, Von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC, 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 159–165.

Costechareyre D, Capo F, Fabre A, Chaduli D, Kellenberger C, Roussel A, Charroux B, Royet J, 2016. Tissue-specific regulation of *Drosophila* NF-kappa B pathway activation by peptidoglycan

recognition protein SC. *J. Innate Immun.*, 8(1): 67 – 80.

De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B, 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.*, 21(11): 2568 – 2579.

Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, Kafatos FC, 2002. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(13): 8814 – 8819.

Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL, 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.*, 6(9): 946 – 953.

Dziarski R, Gupta D, 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.*, 7(8): 232.

Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J, 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881): 640 – 644.

Hansen IA, Attardo GM, Roy SG, Raikhel AS, 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J. Biol. Chem.*, 280(21): 20565 – 20572.

Hays AR, Raikhel AS, 1990. A novel protein produced by the vitellogenic fat body and accumulated in mosquito oocytes. *Roux. Arch. Dev. Biol.*, 199(2): 114 – 121.

Hetru C, Hoffmann JA, 2009. NF-kappa B in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1(6): a000232.

Hou Y, Wang XL, Saha TT, Roy S, Zhao B, Raikhel AS, Zou Z, 2015. Temporal coordination of carbohydrate metabolism during mosquito reproduction. *PLoS Genet.*, 11(7): e1005309.

Hultmark D, 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, 15(1): 12 – 19.

Janeway CAJr, Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 197 – 216.

Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N, 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity*, 20(5): 637 – 649.

Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K, Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh BH, Kurata S, Silverman N, 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.*, 7(7): 715 – 723.

Kim MS, Byun M, Oh BH, 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.*, 4(8): 787 – 793.

Kurata S, 2014. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 42(1): 36 – 41.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(10): 1295 – 1309.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697 – 743.

Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.*, 4(5): 478 – 484.

Lin Z, Li JC, Lu ZY, Zou Z, 2013. Immune aspects of interactions between parasitoid wasps and hosts. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(5): 1203 – 1210. [林哲, 李建成, 路子云, 邹振, 2013. 基于组学的寄生蜂与寄主免疫的相互作用. 应用昆虫学报, 50(5): 1203 – 1210]

Meister S, Agianian B, Turlure F, Relogio A, Morlais I, Kafatos FC, Christophides GK, 2009. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS Pathog.*, 5(8): e1000542.

Mellroth P, Steiner H, 2006. PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350(4): 994 – 999.

Meng Q, Yu HY, Zhang H, Zhu W, Wang ML, Zhang JH, Zhou GL, Li X, Qin QL, Hu SN, Zou Z, 2015. Transcriptomic insight into the immune defenses in the ghost moth, *Hepialus xiaojinensis*, during an *Ophiocordyceps sinensis* fungal infection. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 64: 1 – 15.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyn B, Decaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, Labutti K, Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CF, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'leary S, Orvis J, Pertea M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JM, Vanzee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW, 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316(5832): 1718 – 1723.

Paredes JC, Welchman DP, Poidevin M, Lemaitre B, 2011. Negative regulation by amidase PGRPs shapes the *Drosophila* antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity*, 35(5): 770 – 779.

Royet J, Gupta D, Dziarski R, 2011. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(12): 837 – 851.

Schleifer KH, Kandler O, 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 36(4):

407 – 477.

Schmidt RL, Trejo TR, Plummer TB, Platt JL, Tang AH, 2008. Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in *Drosophila*. *FASEB J.*, 22(3): 918 – 929.

Stenbak CR, Ryu JH, Leulier F, Pili-Floury S, Parquet C, Herve M, Chaput C, Boneca IG, Lee WJ, Lemaitre B, Mengin-Lecreulx D, 2004. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J. Immunol.*, 173(12): 7339 – 7348.

Valanne S, 2014. Functional genomic analysis of the *Drosophila* immune response. *Dev. Comp. Immunol.*, 42(1): 93 – 101.

Wang RJ, Lin Z, Jiang H, Li J, Saha TT, Lu Z, Lu Z, Zou Z, 2017. Comparative analysis of peptidoglycan recognition proteins in endoparasitoid wasp *Microplitis mediator*. *Insect Sci.*, 24(1): 2 – 16.

Wang S, Beerntsen BT, 2015. Functional implications of the peptidoglycan recognition proteins in the immunity of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 24(3): 293 – 310.

Wang XL, Hou Y, Saha TT, Pei GF, Raikhel AS, Zou Z, 2017. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(13): E2709 – E2718.

Wang YH, Jiang H, Cheng Y, An C, Chu Y, Raikhel AS, Zou Z, 2017. Activation of *Aedes aegypti* prophenoloxidase-3 and its role in the immune response against entomopathogenic fungi. *Insect Mol. Biol.*, 26(5): 552 – 563.

Wang YH, Hu Y, Xing LS, Jiang H, Hu SN, Raikhel AS, Zou Z, 2015. A critical role for CLSP2 in the modulation of antifungal immune response in mosquitoes. *PLoS Pathog.*, 11(6): e1004931.

Wang YH, Wang JM, Jiang H, Zou Z, 2013. Research advances on immune mechanism against pathogens in mosquitoes. *Chin. J. Vector Biol. Control*, 24(6): 477 – 482. [王燕红, 王举梅, 江红, 邹振, 2013. 蚊虫对病原体的免疫机制研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 24(6): 477 – 482]

Wang YH, Zheng AH, Liu QY, Kang L, Zou Z, 2017. Advances in the research of vector insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 54(3): 364 – 371. [王燕红, 郑爱华, 刘起勇, 康乐, 邹振, 2017. 虫媒疾病传播媒介的研究进展. 应用昆虫学报, 54(3): 364 – 371]

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK, 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316(5832): 1738 – 1743.

Werner T, Liu G, Kang DW, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772 – 13777.

Xiong GH, Xing LS, Lin Z, Saha TT, Wang C, Jiang H, Zou Z, 2015. High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections. *BMC Genomics.*, 16: 321.

Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M, 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 271(23): 13854 – 13860.

Yu XQ, Zhu YF, Ma C, Fabrick JA, Kanost MR, 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(10): 1287 – 1293.

Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4): 463 – 473.

Zaidman-Remy A, Poidevin M, Herve M, Welchman DP, Paredes JC, Fahlander C, Steiner H, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B, 2011. *Drosophila* immunity: analysis of PGRP-SB1 expression, enzymatic activity and function. *PLoS ONE*, 6(2): e17231.

Zhao B, Hou Y, Wang J, Kokoza VA, Saha TT, Wang XL, Lin L, Zou Z, Raikhel AS, 2016. Determination of juvenile hormone titers by means of LC-MS/MS/MS and a juvenile hormone-responsive Gal4/UAS system in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 77: 69 – 77.

Zhao L, Zhang X, Wei Y, Zhou J, Zhang W, Qin P, Chinta S, Kong X, Liu Y, Yu H, Hu S, Zou Z, Butcher RA, Sun J, 2016. Ascarosides coordinate the dispersal of a plant-parasitic nematode with the metamorphosis of its vector beetle. *Nat. Commun.*, 7: 12341.

Zou Z, Saha TT, Roy S, Shin SW, Backman TW, Girke T, White KP, Raikhel AS, 2013. Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24): E2173 – E2181.

Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, Kokoza V, Raikhel AS, 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 32(1): 41 – 53.

Zou Z, Souza-Neto J, Xi Z, Kokoza V, Shin SW, Dimopoulos G, Raikhel A, 2011. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. *PLoS Pathog.*, 7(11): e1002394.

（责任编辑：马丽萍）